

コナラ組織培養の効率化に関する研究

1996年度～1999年度（県単）

吉田 和広

要 旨

食用きのご栽培用原木に適しているコナラ優良個体の効率的な増殖方法、特に組織培養における作業の効率化と増殖率の向上について検討した。

その結果、外植体として春から夏にかけて伐倒した原木を水挿しして発生した萌芽枝の腋芽を用いるのが良く、また、その時期に伐倒した原木は、ポリエチレン袋に入れ、冷暗所で保存すれば一年を通じて組織培養に使用できることが明らかになった。

表面殺菌は、強酸性水で10分間行い、初代培養は市販肥料 D の500倍水溶液にショ糖20～30g/l 加えたものを用いることにより、通常の培養作業と比較して作業を簡略化することができた。発根には1/2濃度のB T MにI B A 0.3mg/l、I A A 0.2mg/lを加え、さらに活性炭10g/lとショ糖30g/lを加えたものを用いることにより、従来よりも発根率が向上した。得られた幼植物体の順化には、鹿沼土+パーミキュライト混合もしくは鹿沼土+水苔を用いるのが良いと考えられた。

I 目的

食用きのご栽培用原木に適しているコナラ優良個体の大量増殖実用化のためのより効率的な増殖方法を開発する。すでにコナラの組織培養は、腋芽を培養することによって増殖・発根・順化の過程を経て、植物体を再生させることに成功している。しかし、増殖率、発根率、順化後の成長等多くの問題を残しており、本研究では、コナラ組織培養の効率化を目的とする。

II 材料

当センター試験林内に植栽してあるコナラのうち、通直性で選抜した複数のクローン。同一の試験には同一のクローンを用い、材料によるばらつきが出ないようにした。

きがでないようにした。

III 方法

1 効率的な培養方法の検討

(1) 効率的な殺菌方法の検討

70%エタノール、5%過酸化水素水および水を電気分解して得られた強酸性水 (pH2.5) を組み合わせて、外植体の表面殺菌を行った。殺菌した外植体は、両端を切り戻し、培地に挿し付けた。

培地はB T M (Broadleaf Tree Media) にB A P 0.5mg/l 加えたものを用い、寒天濃度は0.8%とした。

(2) 有機成分添加の効果の検討

外植体からのシュート発生率の向上、発生した

シュートの成長促進を図るため、簡略な培地には有機成分(糖類)を加えた培地で初代培養を行った。

培地は、平山ら(1)が報告した市販肥料D (N : P : K = 6.5 : 6 : 19) の500倍水溶液を基本培地として、ショ糖を0~40g/l 加えた。寒天濃度は0.8%とした。

外植体は、70%エタノールで2分間、5%過酸化水素水で5分間表面殺菌した後、滅菌水で2回すすいだ。殺菌した外植体は、両端を切り戻し、培地に挿し付けた。

(3) 支持体の種類によるシュート発生率の違い

培地の支持体の違いによるシュート発生率の違いを調査するために初代培養を行った。培地は、市販肥料Dの500倍水溶液にショ糖20g/l 加えたものを基本培地とし、支持体として、寒天8g/l を加えたものとジェランガム2g/l を加えたものを用いた。

表面殺菌、挿し付けは(2)と同様に行った。

(4) 発根促進法の検討

幼植物体を得るために、初代培養で得られたシュートを発根用培地に植え付けた。

発根用培地は、1/2濃度のBTMに発根促進ホルモンとしてIBA0.3mg/l、IAA0.2mg/l を加え、さらに活性炭10g/l とショ糖30g/l を加えたものを用いた(以下通常法)。

また、発根用培地からホルモン(I BA、I A A)を除いたものを用意し、シュートの切り口をI BA2.5mg/l で1秒間浸漬処理したものを挿し付けた(以下Dip法)。

2 効率的な材料採取方法の検討

(1) 保存期間による萌芽枝発生量の違い

1997年4月1日にコナラを4本伐倒し、長さ約50cmに玉切りした。うち1本はすぐに約25℃の室内で水挿しし、残りはポリエチレン袋に入れ、ガムテープで封をして、約5℃の暗所で保存した。その後、8月中旬、11月初旬、12月下旬にそれぞ

れ保存しておいた試料のうち1本ずつを同様に水挿しした。水挿しして30~40日後に、発生した萌芽枝の本数を数えた。

(2) 保存期間による外植体からのシュート発生率の違い

発生した萌芽枝の腋芽を外植体として初代培養を行った。培地は、平山ら(1)が報告した市販肥料Dの500倍水溶液にショ糖20g/l を加えたものを用いた。寒天濃度は0.8%とした。

表面殺菌、挿し付けは1(2)と同様に行った。

(3) 伐倒時期による萌芽枝発生量の違い

1998年3月31日(春)、7月1日(夏)、10月2日(秋)、1999年1月5日(冬)にそれぞれコナラを1本ずつ伐倒し、長さ約50cmに玉切りした。その後、すぐに約25℃の室内で水挿しした。水挿しして30~40日後に、発生した萌芽枝の本数を数えた。

(4) 伐倒時期による外植体からのシュート発生率の違い

発生した萌芽枝の腋芽を外植体として初代培養を行った。培地は1(1)と同じものを用い、表面殺菌、挿し付けは1(2)と同様に行った。

3 順化方法の検討

得られた幼植物体を野外植栽できるように、順化方法の検討を行った。

用土は、鹿沼土小粒(粒径約3mm)およびバーミキュライトをそれぞれ単体で用いた。用土を詰めた素焼き鉢(2号鉢:直径10.5cm)は175℃、2時間乾熱滅菌し、1(4)で得られた幼植物体を、根から培地をよく洗い落とし、植え付けた。植え付け後は、乾燥を防ぐためにガラスビーカーを被せ、ミスト温室内で管理した(写真-1)。灌水は、2時間に1回、1回1分間、1日に6回行った。また、植え付け後すぐに、1度だけ液肥を施用した。

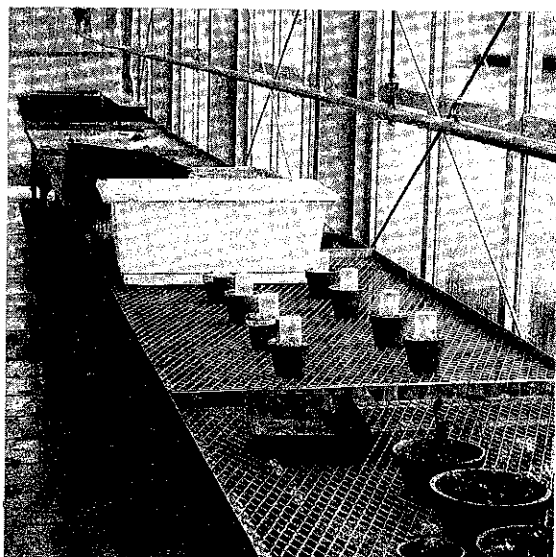
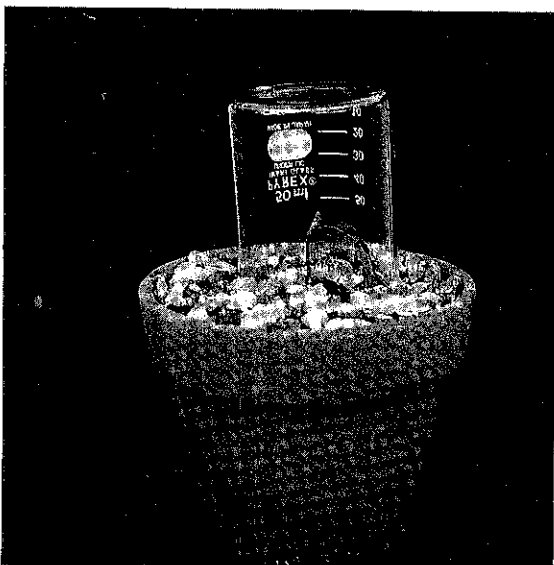
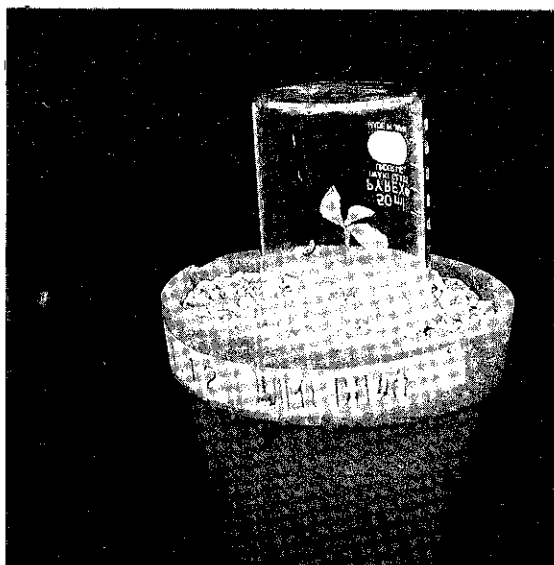


写真-1 順化方法の検討 (上: 鹿沼土、中: パーミキュライト、下: ミスト温室の様子)

IV 結果と考察

1 効率的な培養方法の検討

(1) 効率的な殺菌方法の検討

結果を表-1に示した。全ての処理区で雑菌による汚染は見られず、強酸性水を用いた殺菌法は、従来法と同程度の殺菌効率であった。結果を細かく分析すると、エタノール+強酸性水併用区では枯死や未伸長の割合が多く、強酸性水単用区では従来法と同程度以上のシュートの伸長が見られた。(写真-2)

これらの結果から、エタノール+強酸性水併用では殺菌力が強すぎて、外植体にダメージを与えてしまい、強酸性水単用では、平山ら(1)の報告同様シュートの成長促進効果があると考えられた。そのため、外植体の表面殺菌は、強酸性水単用で10分程度行うのが最も良いと考えられる。しかし、強酸性水の成長促進の作用機作についてはわかっておらず、今後の検討課題である。

(2) 有機成分添加の効果の検討

結果は表-2に示した。ショ糖無添加区では全て枯死した。それに対して、ショ糖20g/l区、30g/l区ではそれぞれ40%、50%の外植体でシュートの発生、伸長、葉の展開が見られた。平山ら(1)の結果では、ショ糖無添加区のシュート発生率は28%であったので、ショ糖を添加することによってシュートの発生率が向上した。

有機成分の添加によって増殖率の向上が期待できるので、今後は他の有機成分(ビタミン等)について検討し、さらなる増殖の効率化を図ることが課題である。

(3) 支持体の種類によるシュート発生率の違い

寒天8g/l培地とジェランガム2g/l培地におけるシュート発生率は、それぞれ44%、32%で、寒天の方が発生率が高かった(表-3)。しかし、有意水準5%で検定を行った結果有意ではなかったため、支持体によってシュート発生率に差はな

表-1 表面殺菌法の検討

殺菌方法	コンタミ	枯死	未伸長	伸長	葉展開	供試数
70%エタノール2分+5%過酸化水素水+すすぎ1回(通常法)	0	0	0	5	3	8
70%エタノール2分+強酸性水5分	0	0	3	5	0	8
70%エタノール2分+強酸性水10分	0	1	5	3	0	9
70%エタノール2分+強酸性水10分+すすぎ1回	0	0	2	5	1	8
強酸性水5分	0	0	0	5	3	8
強酸性水10分	0	0	0	2	6	8
強酸性水10分+すすぎ1回	0	0	0	4	4	8

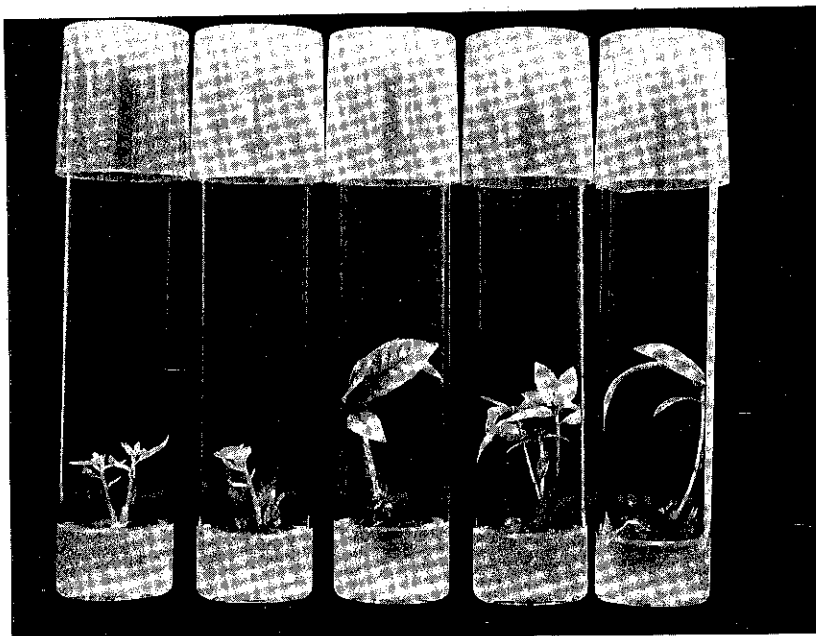


写真-2 強酸性水によるシュート伸長促進効果(左2本は通常法区、右3本は強酸性水10分区)

表-2 ショ糖濃度の違いによるシュート発生状況

ショ糖濃度(g/l)	枯死・未伸長	伸長	葉展開	供試数
0	10	0	0	10
10	8	1	1	10
20	6	4	0	10
30	4	3	1	8

表-3 支持体の違いによるシュート発生状況

支持体の種類	枯死・未伸長	伸長	葉展開	供試数
寒天	28	20	2	50
ゼランガム	34	14	2	50

いと考えられた。

ただし、単価は寒天128円/l、ジェランガム42円/l であるので、少しでも発生率を高めたい場合は寒天、コストを低く抑えたい場合はジェランガム、と使い分けるのが良いと思われる。

4. 発根促進法の検討

通常法では約35%の移植シュートに発根が見られたのに対し、Dip法では約17%の発根率であった(表-4)。このことから、コナラの発根にとっては、低濃度・長時間のオーキシン処理が良いと考えられる。また、通常法による発根率は、既往の結果(1, 2, 3)より良好な場合もあった。このことからオーキシンの組み合わせは、IBA 0.3mg/l、IAA 0.2mg/l が良いと考えられる。

表-4 発根促進法の検討

方 法	発根率 (発根個体数/供試数)
通常法	8 / 23
Dip法	3 / 18

2 効率的な材料採取方法の検討

(1) 保存期間による萌芽枝発生量の違い

結果は表-5に示した。12月下旬(伐倒後268日経過)に水挿ししたのものには、萌芽枝は全く発生しなかった。この試料には、雑菌の汚染や乾燥による割れが多く見られた。

丸太1本あたりの発生萌芽枝数について、有意水準5%で検定を行ったところ、12月下旬に水挿ししたものを除いて、有意差は認められなかった。すなわち、伐倒後7カ月程度までは萌芽枝の発生に関して問題なく保存できるものと考えられた。

(2) 保存期間による外植体からのシュート発生率の違い

結果は表-6に示した。12月下旬に水挿ししたものについては、萌芽枝が発生しなかったので実験は行っていない。

8月に水挿ししたものは、培地に挿し付け後、雑菌による汚染が見られた。これは、夏期であるため、水挿し中に汚染されたものと考えられた。

表-5 保存期間による萌芽枝発生量の違い

水挿しした日 (伐倒後の経過日数)	4月1日 (0日)	8月14日 (135日)	11月4日 (218日)	12月25日 (268日)
丸太の本数	9	12	5	7
発生した萌芽枝数	96	157	36	0
丸太1本あたりの萌芽枝数	10.7	13.1	7.2	0

表-6 保存期間による外植体からのシュート発生率の違い

水挿しした日 (伐倒後の経過日数)	4月1日 (0日)	8月14日 (135日)	11月4日 (218日)
枯死・コンタミ	0	34	0
未伸長	62	39	36
伸長・葉展開	38	27	14
供試数	100	100	50
シュート発生率	38%	27%	28%

シュートの発生率について、有意水準5%で検定を行ったところ、有意差は認められなかった。

このことから、原木の保存期間によらず、発生した萌芽枝は組織培養の外植体として利用でき、活性等も落ちていないことが明らかになった。

(3) 伐倒時期による萌芽枝発生量の違い

結果は表-7に示したとおり、いずれの時期に伐倒した原木においても萌芽枝は発生した。

丸太1本あたりの発生萌芽枝数について、一元配置分散分析を行ったところ、夏に伐倒したものと冬に伐倒したものと間に有意水準5%で有意差があった以外は差が無かった。このことは、生長休止期の丸太では萌芽枝の発生、伸長が良好で

あるとした佐々木(3)の結果と一致する。

(4) 伐倒時期による外植体からのシュート発生率の違い

結果は表-8に示した。春および夏に伐倒したものから得た外植体を培養することによってシュートが発生し、春よりも夏が多く発生した。また、秋および冬に伐倒したものから得た外植体で組織培養を行った結果、全て褐変枯死してしまった。このことは、落葉期～休眠期にかけて原木の生理状態が変化するためであり、培養(伸長)するという目的には不適當であると考えられる。

これらのことから、萌芽枝は伐倒時期によらず発生するが、秋～冬にかけて伐倒した原木の萌芽

表-7 伐倒時期による萌芽枝発生量の違い

伐倒時期	4月1日	7月1日	10月2日	1月5日
丸太の本数	9	14	16	16
発生した萌芽枝数	96	135	204	270
丸太1本あたりの平均萌芽枝数	10.7	9.6	12.8	16.9

(平均萌芽枝数の差の検定：最小有意差法による)

	4月	7月	10月	1月
4月				
7月				*
10月				
1月		*		

*印のあるところは、その間に有意水準5%で差があることを示す

表-8 伐倒時期による外植体からのシュート発生率の違い

伐倒時期	4月1日	7月1日	10月2日	1月5日
枯死・コンタミ	0	6	50	50
未伸長	62	16	0	0
伸長・葉展開	38	38	0	0
供試数	100	60	50	50
シュート発生率(%)	38	63	0	0

枝は、組織培養の外植体としては適当でないことが明らかになった。

3 順化方法の検討

用土の状態を確認すると、鹿沼土は乾燥しており、パーミキュライトは過湿であった。植え付けた苗を一度掘り取り、根の状態を観察してみたところ、鹿沼土区では新たな根の伸長が見られたのに対して、パーミキュライト区では過湿によって根が腐っているのが観察された(写真-3)。これらのことから、順化用土は、鹿沼土とパーミキュライトを混合して適湿を保つか、鹿沼土単用で植え付け、根の伸長を促し、表面を水苔等で覆い乾燥を防ぐのが良いと考えられる。

V まとめ

コナラ組織培養は、①春～夏に原木を伐倒する、②伐倒した原木はポリエチレン袋に入れて冷暗所で保存する、③原木を室内で水挿しして発生した萌芽枝を外植体とする、④シュートの発生にはBTMもしくは市販肥料Dの500倍水溶液を基本培地とした培地を用いる、⑤発根には1/2BTMに低濃度のオーキシンを加えた培地を用いる、⑥順

化には鹿沼土+パーミキュライトもしくは鹿沼土+水苔を用土として用いる、ことにより、1年を通じて、効率的に培養することが可能となった。

しかし、個体差やエイジングの問題によって、安定して大量増殖が可能な培養系は、まだ確立には至っていない(3)。

また、大量増殖法には、不定胚を誘導する方法(3)があるが、本研究の目的はクローン増殖であるため検討は行わなかった。

VI 参考文献

- (1) 平山一木、竹内英男：コナラの育種に関する研究 愛知林セ報33：59～62 1996
- (2) 小山真澄：コナラ(最新バイオテクノロジー全書編集委員会編 木本植物の増殖と育種 最新バイオテクノロジー全書6)：138～145 1989
- (3) 佐々木義則：クヌギ・コナラの組織培養(石井克明編 組織培養法を用いた優良樹木苗の生産—森林の多様性保全と遺伝資源の保存のために—わかりやすい林業研究解説シリーズ108)：52～72 2000

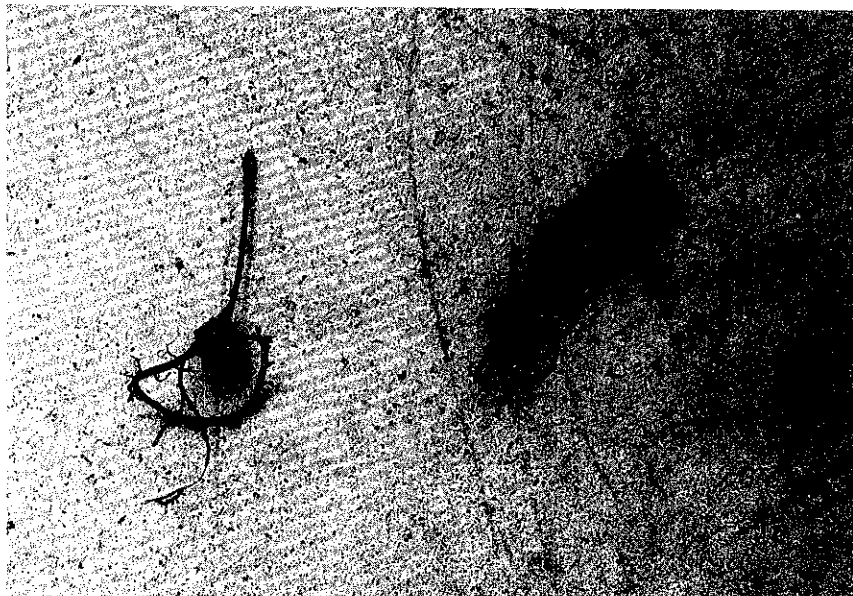


写真-3 用土による根系発達の違い(左：鹿沼土区、右：パーミキュライト区)

